

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

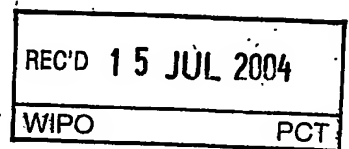
24.5.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 4 月 2 8 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 1 2 4 3 4 5
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 1 2 4 3 4 5]



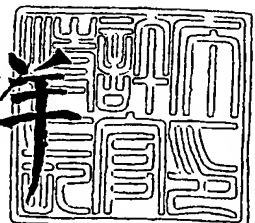
出 願 人
Applicant(s): 積水化学工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 7 月 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願

【整理番号】 03P00735

【提出日】 平成15年 4月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07G 17/00

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社
内

【氏名】 新村 和夫

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社
内

【氏名】 北原 慎一郎

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社
内

【氏名】 阿部 佳子

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社
内

【氏名】 栗山 澄

【特許出願人】

【識別番号】 000002174

【氏名又は名称】 積水化学工業株式会社

【代表者】 大久保 尚武

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005083

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 サイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 水に不溶性の担体とサイトカイン誘導剤とを含有することを特徴とするサイトカイン誘導用具。

【請求項2】 体外にて血液又は血液成分と接触することを特徴とする請求項1記載のサイトカイン誘導用具。

【請求項3】 担体は、中心線平均粗さ R_a 値が $0.2 \sim 10 \mu m$ である表面を有することを特徴とする請求項1又は2記載のサイトカイン誘導用具。

【請求項4】 担体は、多孔性であることを特徴とする請求項1、2又は3記載のサイトカイン誘導用具。

【請求項5】 担体は、巨大網目構造を有することを特徴とする請求項1、2、3又は4記載のサイトカイン誘導用具。

【請求項6】 担体は、細孔分布が $2 \sim 2000 \text{ \AA}$ であることを特徴とする請求項1、2、3、4又は5記載のサイトカイン誘導用具。

【請求項7】 水に不溶性の担体に固定化されたサイトカイン誘導剤と、それを収容する容器とからなることを特徴とする請求項1、2、3、4、5又は6記載のサイトカイン誘導用具。

【請求項8】 誘導されるサイトカインが、インターフェロン γ 、インターロイキン2、インターロイキン10、インターロイキン12、腫瘍壊死因子 α 、及び、トランスフォーミング増殖因子 β からなる群から選択される少なくとも1種のサイトカインであることを特徴とする請求項1、2、3、4、5、6又は7記載のサイトカイン誘導用具。

【請求項9】 容器は、血液又は血液成分の導入部と導出部とを有することを特徴とする請求項1、2、3、4、5、6、7又は8記載のサイトカイン誘導用具。

【請求項10】 請求項1、2、3、4、5、6、7、8又は9記載のサイトカイン誘導用具を用いることを特徴とするサイトカイン誘導方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、サイトカイン誘導療法等に用いられ、効果的にサイトカインを誘導し得るサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

サイトカインは、多種多様な細胞間情報伝達因子の総称である。サイトカインとしては、例えば、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ (IFN- γ)、インターロイキン1～インターロイキン27、腫瘍壊死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α 、TNF- α)、腫瘍壊死因子- β (Tumor Necrosis Factor- β)、トランスフォーミング増殖因子- α (Transforming Growth Factor- α)、トランスフォーミング増殖因子- β (Transforming Growth Factor- β 、TGF- β)、及び、各種細胞増殖因子等が挙げられる(非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3)。

【0003】

サイトカインは生体内で様々な活性を有し、様々な疾患に関与していることが知られている。このようなサイトカインの活性を生体内で惹起して疾患の治療を行う、サイトカイン誘導療法が従来より行われている。サイトカイン誘導療法では、患者に、サイトカイン誘導剤を投与し、生体内においてサイトカインの誘導を引き起こす。このようなサイトカイン誘導療法に用いられるサイトカイン誘導物質として、様々な物質が知られている。例えば、微生物由来のサイトカイン誘導物質としては、OK-432、BCG、ベスタチン、丸山ワクチン、又は、ロムリチド等が知られており、担子菌類由来のサイトカイン誘導物質としては、クレスチン、レンチナン、又は、シゾフィラン等が知られている。

【0004】

例えば、OK-432やBCG等は血液等からインターロイキン1やインターフェロン γ 等のサイトカインを誘導することが知られている(非特許文献4、非特許文献5)。

【0005】

上述したサイトカイン誘導療法では、生体内でサイトカインを誘導することはできるが、充分量のサイトカインを誘導することが困難であり、強い効力を発揮させ難いという問題があった。また、サイトカインを効果的に誘導するために、サイトカイン誘導剤の投与量が多くなり、副作用が大きくなり、治療を有効に行い得ないという問題もあった。

【0006】

特許文献1には不溶性担体に刺激剤が共有結合されている悪性腫瘍治療用白血球刺激材が記載されている。また、特許文献2にはインターロイキン1、OK-432、遺伝子組み換えインターロイキン2、又は、 γ -インターフェロンを不溶性担体に共有結合で結合してなる癌治療用白血球刺激材が記載されている。これらは白血球を刺激して、白血球の腫瘍障害性細胞としての活性を誘導するものであり、これらの先行技術文献にはサイトカイン誘導については全く述べられていない。

【0007】

一方、体外で体外循環システム等を用いて血液と不溶性材料等とを接触させる方法も検討されている。従来の体外循環システム等は血液中の有害物質の除去を目的とするものであり、むしろサイトカイン誘導を抑制することが必要であると考えられている。

【0008】

また、輸血等に用いる血液では、血液バッグに貯蔵して保存する方法が用いられているが、これらの場合もサイトカインの誘導を抑えることが必要であるとされている。

すなわち、これまでの体外で血液を処理する用具ではサイトカインの誘導を抑えることが必須であると考えられており、積極的にサイトカインの産生を誘導するサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法は全く知られていないのが現状であった。

また、サイトカイン、特にインターフェロン γ やトランスフォーミング増殖因子- β 等を血液や血液細胞から有効に誘導する方法はこれまでに知られていない。

【0009】

【非特許文献1】

臨床免疫第27巻特別増刊号1995年「サイトカインのすべて」科学評論社

【非特許文献2】

臨床免疫第36巻、39-44、2001年

【非特許文献3】

臨床免疫第39巻、189-200、2003年

【非特許文献4】

岐阜大医紀43:166-177、1995年

【非特許文献5】

Molecular medicine Vol. 36、臨時増刊号、220-229、1999年

【特許文献1】

特開昭60-120821号公報

【特許文献2】

特開昭61-277628号公報

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記現状に鑑み、効果的なサイトカイン誘導療法を実現することを可能とする新規なサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明は、水に不溶性の担体とサイトカイン誘導剤とを含有するサイトカイン誘導用具である。

本願発明者らは、水に不溶性の担体に固定化されたサイトカイン誘導剤が収納された容器内で、血液又は血液成分がサイトカイン誘導剤に接触することにより、体外にて著しく高いサイトカイン誘導量を示すことを見だし、実用化が期待できるサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法を完成した。

以下に本発明を詳述する。

【0012】

本発明のサイトカイン誘導用具は、水に不溶性の担体含有する。

上記担体としては特に限定されず、水に不溶性であればよく、例えば、金属、有機物又は無機物等により構成され、好ましくは有機物材料、より好ましくは高分子材料からなる。

【0013】上記金属としては、例えば、金若しくは金合金、銀若しくは銀合金、チタン若しくはチタン合金、又は、ステンレス等が挙げられる。

上記無機物としては、例えば、活性炭、ガラス又はガラスの誘導体、シリカ系組成物、アルミナ、ヒドロキシアパタイト等が挙げられる。

【0014】

上記有機物材料又は高分子材料としては、例えば、セルロース系、アガロース系、デキストラン系、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエチレンテレフタレート系、ナイロン系、ポリビニルアルコール系、ポリスルホン系、ポリアミド系、ポリアクリロニトリル系、ポリエチレン系、ポリウレタン系、ポリプロピレン系、ポリエステル系等の材料が挙げられる。

【0015】

上記ポリスチレン系の材料としては、例えば、ジビニルベンゼン-スチレン共重合体等が挙げられ、アクリルエステル系の材料としては、例えば、ポリメチルメタクリレート、ポリヒドロキシエチルメタクリレート等が挙げられる。

上記担体としては、なかでも、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ナイロン系、ポリエステル系、セルロース系、ポリビニルアルコール系の高分子材料からなるものが好ましい。

【0016】

上記担体は無極性であり、かつ、疎水性であってもよく、この場合、担体としては、ポリスチレン系高分子材料等を用いることができる。また、これらの担体には、必要に応じて、表面修飾や表面コーティング等により、表面に極性や親水性を付与することもできる。

【0017】

上記担体の形状としては特に限定されず、例えば、繊維状、不織布状、スポンジ状、粒子状、膜状、中空糸状等の公知の形状を用いることができる。

上記担体の大きさとしては、粒子状では好ましい下限は $50\ \mu\text{m}$ 、好ましい上限は 2mm であり、繊維状では繊維径が $10\ \mu\text{m}$ 以下であることが好ましく、 $5\ \mu\text{m}$ 以下であることがより好ましい。

上記担体が繊維状である場合は不織布からなることが好ましく、繊維径は $3\ \mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。

【0018】

上記担体は、白血球を吸着する材料からなることが好ましく、白血球を吸着する材料としては、例えば、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、ポリビニルアルコール系、又は、酢酸セルロース等のセルロース系材料からなる高分子材料やガラス系の材料等が挙げられる。

【0019】

上記担体としては、多孔性高分子材料からなるものが好ましい。

上記多孔性高分子材料の表面積としては、 $400\text{m}^2/\text{g}$ 以上であることが好ましく、細孔容積としては、 $0.5\text{mL}/\text{g}$ であることが好ましく、平均細孔径としては、下限が 20\AA 、上限が 800\AA であることが好ましい。

【0020】

上記多孔性高分子材料を大別すると標準的なゲル構造をもつゲル型と、巨大網目構造 (Macro reticular structure) をもつMR型とに分けられる。また、単にスチレンとジビニルベンゼンのような架橋剤を用いて重合して得られた多孔性樹脂等は透明に近く、ゲル構造を呈するのでゲル型多孔性樹脂と呼ばれる。一方、特殊な重合法によると物理的に多孔性の樹脂等を製造することができ、このような樹脂はMR型又はポーラス型多孔性樹脂と呼ばれる。更に、懸濁重合の際において水に不溶でモノマーだけを溶かすことのできる特殊な有機溶剤を使用することにより、粒子の内部奥にまで大きな孔 (マクロポア) をもったMR型又はポーラス型の粒子を作製することができる。

【0021】

粒子状の多孔性高分子材料としては、例えば、強酸性陽イオン交換樹脂、弱酸性

陽イオン交換樹脂、強塩基性陰イオン交換樹脂、弱塩基性陰イオン交換樹脂、合成吸着剤の他、キレート樹脂等からなるものが挙げられる。これらの多孔性粒子は公知の方法によって得ることができ、例えば、原料モノマーをゼラチン等の適当な懸濁安定剤を用いて水中で懸濁重合することにより球状の重合体として製造される。上記原料モノマーとしては、スチレン、ビニルトルエン、アクリル酸エチル、メタクリル酸メチル、アクリロニトリル等のエチレン性二重結合を有する化合物が用いられ、これにジビニルベンゼン、エチレンジメタクリレート等の多官能性モノマーである架橋剤を加え、多孔化剤の存在下過酸化ベンゾイル、アゾビスイソブチルニトリル等の重合開始剤を用いて架橋重合体を得る。上記多孔性粒子のうち市販されているものとしては、例えば、三菱化学社製ダイヤイオン（登録商標）、ロームアンドハース社製アンバーライト等、ダウケミカル製ダウエックス等が挙げられる。

【0022】

上記担体としては、巨大網目構造を有する多孔性高分子材料がより好ましい。上記巨大網目構造の細孔分布としては、下限が 2 \AA 、上限が 2000 \AA であることが好ましく、より好ましい上限は 300 \AA である。

【0023】

上記担体は、表面粗さを付与された材料からなることが好ましく、その中心線平均粗さ R_a 値は、下限が $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 、上限が $10\text{ }\mu\text{m}$ であることが好ましい。

【0024】

上記担体の表面に R_a 値が $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 以上の粗さを付与することにより、著しくサイトカインの誘導が増強される。また、この表面粗さのサイトカイン誘導増強作用は、白血球の大きさが $10\sim 20\text{ }\mu\text{m}$ であることを考えると、白血球に比べて上記 R_a 値が非常に小さいため、単なる接触表面積の増大によるものでないと考えられる。

ここで、上記 R_a 値とは J I S B 0 6 0 1 - 1 9 8 2 における中心線平均粗さである。

【0025】

上記担体は、更に、凹凸平均間隔 S_m 値が下限が $5\text{ }\mu\text{m}$ 、上限が $200\text{ }\mu\text{m}$ であ

る範囲にある凹凸を表面に有する材料からなることが好ましい。

ここで、上記凸凹平均間隔 S_m 値は、以下のようにして定義される値である。

【0026】

まず、図1に示す粗さ曲線Aの中心線Bに対して、それぞれ、一定の高さ及び深さの位置に上側カウントレベルC及び下側カウントレベルDを引く。次に、下側のカウントレベルDと粗さ曲線Aとが交差する2点間において、上側カウントレベルと粗さ曲線とが交差する点が一回以上存在するときに、一つの山として「山」を定義する。

そして、凹凸平均間隔 S_m 値は、図2に示すように、基準長さ L の間にある山の間隔を S_{mi} としたときに、下記の式①で定義される値である。

【0027】

【数1】

$$S_m = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n S_{mi} \quad (n: \text{山数}) \quad \dots \textcircled{1}$$

【0028】

すなわち、凹凸平均間隔 S_m 値とは、基準長さ L の間にある山同士の間隔の平均値を示す。このようにして、凹凸の平均間隔 S_m 値により、凸凹の面方向の条件が定義される。

【0029】

現在の JIS 規格では、表面粗さの高さ方向の情報については規定されているが、面方向の情報に関しては規定されていない。しかしながら、本発明における表面粗さは、凸凹の面方向における間隔によっても特徴付けられるものである。

【0030】

上記担体の表面粗さは材料の多孔性等に由来するものであっても良い。上記担体に用いられる多孔性高分子材料としては、例えば、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、セルロース系、ポリビニルアルコール系等の材料が挙げられる。

【0031】

上記担体の表面粗さは材料の繊維形状に由来するものであっても良く、その場合、上記担体としては、繊維状材料又は不織布状材料からなるものが好ましい。上記繊維状材料又は不織布状材料としては、例えば、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、セルロース系、ポリビニルアルコール系等の高分子材料からなるものが挙げられる。

【0032】

本発明のサイトカイン誘導用具は、サイトカイン誘導剤を含有する。

上記サイトカイン誘導剤としては、例えば、BCG、BCG-CWS、PPD、Nocardia-CWS、OK-432、Muramyl dipeptide等の細菌類やその成分；PSK、レンチナン、シゾフィラン等の多糖類；ポリI：C、ポリA：U等のポリマー；Levamisole、DNCB、Azimexon、Tilorone、Bestatin等の化学物質が挙げられる。また、上記のような生理活性物質に限らず、菌体、菌体成分、ペプチド類、核酸類、蛋白質、糖成分、脂質等の様々な物質もサイトカイン誘導剤として用いられ得る。

【0033】

これらサイトカイン誘導剤の中でも、菌体及びその菌体由来成分が好ましい。なかでも、抗酸菌と抗酸菌由来成分がより好ましく、結核菌や結核菌由来成分が特に好ましい。牛型結核菌弱毒株であるBCGとその由来成分も特に好ましい。

【0034】

また、サイトカイン誘導剤としては溶連菌と溶連菌由来成分も好ましい。上記溶連菌と溶連菌由来成分としては、例えば、ストレプトコックス・ピオゲネス（A群3型）Su株ペニシリン処理凍結乾燥品であるOK-432やOK-432から抽出・精製されたOK-432由来成分が挙げられる。

また、上記サイトカイン誘導剤としては、放線菌及び放線菌由来成分も好ましい。

また、上記上記サイトカイン誘導剤のみではサイトカイン誘導能を充分に発揮し得ないものであっても、上記不溶性の担体に固定化して用いることにより、サイトカイン誘導活性を発揮させることもできる。従って、本発明におけるサイトカ

イン誘導剤としては、従来より用いられているサイトカイン誘導物質の他、様々な物質を用いることができる。

【0035】

上記サイトカイン誘導剤を担体の表面に固定化する方法としては特に限定されず、例えば、物理吸着、共有結合、イオン結合等の公知の方法を用いることができる。また、共有結合等により上記サイトカイン誘導剤を担体の表面に固定化する場合には、必要に応じて、サイトカイン誘導剤と担体との結合部に任意の長さをもつスペーサーを導入することが好ましい。

【0036】

上記サイトカイン誘導剤が菌体等である場合は、必要に応じて、固定化する前に菌体の洗浄操作や破碎操作、成分分画操作等のさまざまな前処理を施してもよい。また、上記サイトカイン誘導剤が生菌等である場合は、より安全性を高めるために、必要に応じて、固定化する前、固定化と同時、固定化の後のいずれの時点でも、加熱処理・薬品処理・放射線処理・ガス滅菌処理等のさまざまな方法により死菌化させてもよい。上記加熱処理としては、例えば、オートクレーブ処理が挙げられ、上記薬品処理としては、例えば、グルタルアルデヒド処理、ホルマリン処理、又は、エタノール処理が挙げられ、上記放射線処理としては、例えば、 γ 線処理が挙げられ、上記ガス滅菌処理としては、例えば、エチレンオキシドガス処理等が挙げられる。

上記サイトカイン誘導剤としては、蛋白質変性剤で変性されているものが好適に用いられる。上記蛋白質変性剤としては、例えば、グルタルアルデヒド、ホルマリン、エタノール等の各種溶剤や界面活性剤等が挙げられる。また、加熱処理等も蛋白質変作用を発揮するので、水溶液中での加熱処理等も上記蛋白質変性剤に含まれる。なかでも、ホルマリンにより変性されたサイトカイン誘導剤がより好ましい。

【0037】

また、BCGのような微生物からなるサイトカイン誘導剤を担体に固定化する場合には、菌体表面外壁成分のアミノ酸や糖成分等を介して、担体のカルボキシル基、アミノ基及び／又はエポキシ基等の官能基に結合させることができる。この

とき、必要に応じてさまざまな鎖長や構造のスペーサーを導入することもできる。

【0038】

BCGのような微生物の菌体外層が脂質等により覆われている場合には、必要に応じて脂質を洗浄除去した後、結合することもできる。また、固定化法としては、物理吸着法が好ましい。サイトカイン誘導剤を物理吸着法によって担体に固定化することもできる。特に疎水性表面を有する担体にBCGのようなサイトカイン誘導剤を物理吸着作用によって固定化することができる。また、サイトカイン誘導剤が微生物やその成分からなる場合等は、その表面が電荷を帯びている場合にも、その対極電荷を表面に有する担体に物理吸着作用によって固定化することができる。

【0039】

上記担体の使用割合としては特に限定されないが、粒子状の担体として用いる場合には、血液容積に対する担体のかさ体積量として、下限は0.02%、上限は80%程度であり、好ましい下限は0.1%、好ましい上限は50%程度である。

【0040】

上記サイトカイン誘導剤の使用割合としては特に限定されないが、例えば、BCGである場合は、血液に添加される濃度として、乾燥重量で下限は0.001mg/mL、上限は10mg/mLであることが好ましい。また、上記サイトカイン誘導剤がOK-432である場合は、血液に添加される濃度として、下限は0.0001KE/mL、上限は10KE/mLであることが好ましい。

【0041】

本発明のサイトカイン誘導用具は、不溶性の担体に固定化されたサイトカイン誘導剤と、それを収容する容器とからなることが好ましい。これにより、容器内にて、上記の担体に固定化されたサイトカイン誘導剤が、血液又は血液成分等に接触し、血液又は血液成分等の中でサイトカインが効果的に誘導される。この場合、接触温度を下限は15℃、上限は42℃の範囲とすることが好ましく、それによって、サイトカインの誘導をより効果的に引き起こすことができる。

【0042】

上記容器の構造としては特に限定されないが、図3に模式的に示すように、血液等の導入部1と、サイトカイン誘導剤と接触した血液4等を容器外に導く導出部2とが備えられている容器3が好ましい。

上記容器としては、血液バッグ状の容器等がより好ましい。

【0043】

また、上記容器としては、体外循環システム等に用いられるカラム状の容器も用いることができる。しかしながら、上記容器としてこれらの体外循環システム等を用いた場合には、上記担体に固定化されたサイトカイン誘導剤が、容器内にて血液又は血液成分等と接触する時間が限定されるので、必要なサイトカインを誘導することが困難である。

本発明のサイトカイン誘導用具は、上記サイトカイン誘導剤と接触させた血液等を容器外に導く場合に、担体及び／又はサイトカイン誘導剤が血液に混入しないように流出防止機構が備えられていることがより好ましい。

【0044】

図3に模式的に示すように、流出防止機構5としては、上記担体が容器3内部に固定化されていることであっても良く、また、例えば、流出防止用の分離膜や分離フィルター等が設けられていても良い。

【0045】

本発明のサイトカイン誘導用具の1実施態様としては、例えば、導入部と導出部とを有する血液バッグに、粒子状、繊維状、不織布状等の担体に固定化されたサイトカイン誘導剤を充填し、ここに血液又は血液成分等を導入する。その後、所定温度で所定時間インキュベートをし、サイトカインを誘導した血液又は血液成分等を導出部から取り出し、点滴等によるサイトカイン誘導療法等に利用することができる。これらの血液バッグの容量としては下限は50mL、上限は1000mLであることが好ましく、より好ましい下限は100mL、より好ましい上限は400mLである。

【0046】

本発明のサイトカイン誘導用具を用いて実施するサイトカイン誘導方法もまた、

本発明の1つである。

本発明のサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法により誘導されるサイトカインとしては特に限定されないが、なかでも、インターフェロン γ (IFN- γ)、インターロイキン2 (IL-2)、インターロイキン10 (IL-10)、インターロイキン12 (IL-12)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β) が好適に挙げられる。例えば、IFN- γ はリウマチ等の免疫疾患、炎症性疾患、アレルギー性疾患、癌等のさまざまな疾患において非常に重要な役割を担っているサイトカインであり、IFN- γ を誘導することによりこれらの疾患に対する治療効果が期待できる。必要によっては、担体に固定化されたサイトカイン誘導剤と接触させた血液等から、血漿や血清成分等を分離して治療等に用いてもよい。

【0047】

本発明のサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法は、血液又は血液成分等に限らず、骨髓系細胞、表皮細胞、繊維芽細胞、肝細胞、骨芽細胞、血液幹細胞、胚性幹細胞等の組織から採取した細胞や培養細胞、株化細胞等の様々な細胞からもサイトカインを誘導することができる。

【0048】

【実施例】

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0049】

(実施例1)

担体1 (ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体合成吸着剤、三菱化学社製、商品名: ダイヤイオンHP-50、多孔性粒子) を精製水 (大塚製薬社製) にてデカンテーションにより洗浄し、しかる後メタノール (和光純薬社製、HPLC用) にてデカンテーションすることにより洗浄した。次に、注射用生理食塩水 (大塚製薬社製) にて担体1 をデカンテーションにより洗浄した。

【0050】

BCG (日本ビーシージー製造社製) を生理食塩水に懸濁して、リン酸緩衝液に

て希釈し、4000 rpmにて15分間遠心操作を行った。上清を捨て、再びリン酸緩衝液にて懸濁し、4000 rpmにて15分間遠心操作を行った。これを3回行い、次に50%エタノール含有リン酸緩衝液にて懸濁し、4000 rpm (トミー精工社製、微量高速遠心機MRX-150) にて15分間遠心操作を行った。上清を捨て、次にエタノールにて懸濁し、4000 rpmにて15分間遠心操作を行った。これを2回行い、再びリン酸緩衝液での洗浄を3回行った。この処理済みBCG 2 mgをカルボキシル基を導入した担体1 (かさ体積1 mL) にカルボジイミド法にて共有結合させた。担体1に残存した未反応基をエタノールアミンにて反応させ、リン酸緩衝液にて洗浄後、リン酸緩衝液に懸濁した。このようにして得られた担体1をかさ体積で100 μ Lとり、滅菌済みチューブ (ダイアヤトロン社製、エッペンドルフチューブ1.5 mL用) に充填した。

【0051】

健常人から採血し、ヘパリン15 IU/mL含有静脈血を得た。この血液約1.4 mLを上記の担体1を充填したチューブに添加した。

次に、チューブを転倒混和して血液を攪拌し、ロータリーミキサー (TAITEC社製) に取り付け、6 rpmで転倒混和させつつ、37℃にて24時間恒温槽中でインキュベートした。インキュベート後の血液を4℃で3500 rpm (トミー精工社製、微量高速遠心機MRX-150) で15分間遠心し、しかる後血漿を採取し、-70℃で該血漿を凍結保存した。次いで、保存された血漿を融解し、Human IFN- γ ELISAキット (R&D System社製又はENDOGEN社製) にて血漿中のIFN- γ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後において、血漿中のIFN- γ の値は全て10 pg/mL以下であった。

【0052】

(比較例1)

BCGを用いなかったことを除いては、実施例1と同様にしてIFN- γ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

【0053】

【表 1】

	IFN- γ 誘導量 (pg/mL)
実施例 1	32
比較例 1	<10

【0054】

(実施例 2)

担体 2 (オルガノ社製、商品名: アンバーライト XAD 4、多孔性ポリスチレン粒子、MR 型、細孔分布 2 ~ 150 Å、表面積 700 m²/g 以上、細孔容積 0.5 mL/g 以上、平均細孔径約 120 Å) をかさ体積 1 mL と BCG (10 mg/mL) とを 1 mL 生理食塩水中で 37℃ にて 20 時間混和し、BCG を担体粒子表面に物理吸着させた。混和後、この粒子を生理食塩水にて充分洗浄し、再び生理食塩水に懸濁した。このようにして得られた担体 2 のかさ体積 100 μ L を滅菌済みチューブに充填した。

以下、実施例 1 と同様な操作を行い、健常人 2 名の血液により IFN- γ を誘導し、その量を測定した。結果を表 2 に示した。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後において、血漿中の IFN- γ の値は全て 10 pg/mL 以下であった。

【0055】

(比較例 2)

BCG を用いなかったことを除いては、実施例 2 と同様にして IFN- γ の誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

【0056】

【表 2】

	IFN- γ 誘導量 (pg/mL)	
	被採血者	
	A	B
実施例 2	396	109
比較例 2	<10	<10

【0057】

(実施例 3)

担体 2 (オルガノ社製、商品名: アンバーライト XAD 4、多孔性ポリスチレン粒子、MR 型、細孔分布 2 ~ 150 Å、表面積 700 m²/g 以上、細孔容積 0.5 mL/g 以上、平均細孔径約 120 Å) をかさ体積 1 mL と BCG (10 mg/mL) とを 1 mL の 1 容積%ホルマリン液 (中性緩衝ホルマリン液、和光純薬工業社製) 含有生理食塩水中で 4℃にて 20 時間混和し、BCG を担体 2 表面に物理吸着させた。混和後、この担体 2 を生理食塩水にて充分洗浄した後、かさ体積で 100 μL を滅菌済みチューブに充填した。

以下、実施例 1 と同様な操作を行い、IFN-γ の誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後に、血漿中の IFN-γ の値は全て 10 pg/mL 以下であった。

【0058】

(比較例 3)

BCG を用いなかったことを除いては、実施例 3 と同様にして IFN-γ の誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

【0059】

【表 3】

	IFN-γ 誘導量 (pg/mL)
実施例 3	388
比較例 3	<10

【0060】

(実施例 4)

実施例 3 と同様に作製した BCG を担体表面に物理吸着させた担体 2 をかさ体積で 4 mL 血液バッグ (テルモ社製、分離バッグ 200 mL 用) に充填した。健常人から採血して得たヘパリン 15 IU/mL 含有の静脈血 50 mL をこの血液バッグに導入した。この血液バッグを 37℃で 24 時間、穏やかに攪拌しながらインキュベートした。この血液中の IFN-γ を実施例 1 と同様に測定した。結果を表 4 に示した。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後に

において、血漿中の I F N - γ の値は全て 1 0 p g / m L 以下であった。

【 0 0 6 1 】

(比較例 4)

B C G を用いなかったことを除いては、実施例 4 と同様にして I F N - γ の誘導量を測定した。結果を表 4 に示した。

【 0 0 6 2 】

【表 4】

	IFN- γ 誘導量 (pg/mL)
実施例 4	3 6 2
比較例 4	< 1 0

【 0 0 6 3 】

(実施例 5 ~ 1 0)

担体 3 として、C A フィルム (アートプラス社製、酢酸セルロースフィルム、商品名: アセチフィルム V R - R) を用い、フィルム表面をメチルアルコールで 2 4 時間、ソックスレー抽出を行って可塑剤を抽出し、フィルムを取り出した後、1 5 時間風乾後、更に 8 0 $^{\circ}$ C で 5 時間乾燥した。その後、ストルアス社 (デンマーク) 製自動研磨機 (商品名: プラノボールペデマックス) に、2 2 0、5 0 0、1 2 0 0、2 4 0 0、及び、4 0 0 0 メッシュのサンドペーパーを取り付けたものを用いて、上記 C A フィルムを研磨し、両側の表面に表面粗さを持つ研磨済み C A フィルムを作製した。このフィルムをメチルアルコールで洗浄後、5 m m \times 5 m m の大きさに細片化し、かさ体積で約 2 0 0 μ L となるようにはかり取った。これらの細片を注射用生理食塩水で洗浄後、1 . 5 m L 用滅菌済みチューブに充填した。

【 0 0 6 4 】

健常人から採血し、ヘパリン 1 5 I U / m L 含有静脈血を得た。血液に 1 m g / m L の濃度となるように B C G (日本 B C G 製造社製) を添加し、血液約 1 . 3 m L を上記充填チューブに添加し、実施例 1 と同様にして I F N - γ 誘導量を測定した。結果を表 5 に示した。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後に

において、血漿中の IFN- γ の値は全て 10 pg/mL 以下であった。また、BCG だけを 1 mg/mL となるように血液に添加し、同様にして IFN- γ 濃度を測定した場合は 31 pg/mL であった。

【0065】

【表 5】

	実施例					
	5	6	7	8	9	10
	未研磨	研磨				
		4000 メッシュ	2400 メッシュ	1200 メッシュ	500 メッシュ	220 メッシュ
Ra 値 (μm)	0.05	0.05	0.06	0.58	1.28	2.37
Sm 値 (μm)	250	125	31	30	44	57
BCG 濃度 (mg/mL)	1	1	1	1	1	1
IFN- γ 誘導量 (pg/mL)	38	72	79	172	193	189
BCG 濃度 0 (mg/mL) 時の IFN- γ 濃度 (pg/mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10

【0066】

(実施例 11~16)

担体として、PET フィルム（ユニチカ社製、ポリエチレンテレフタレートフィルム、商品名：エンブレット S-75）を用い、フィルム表面をメチルアルコールで洗浄した後、ストルアス社（デンマーク）製自動研磨機（商品名：プラノボールペデマックス）に、220、500、1200、2400、及び、4000 メッシュのサンドペーパーを取り付けたものを用いて、PET フィルムを研磨し、両側の表面に表面粗さを持つ研磨済み PET フィルムを作製した。このフィルムをメチルアルコールで洗浄後、5 mm×5 mm の大きさに細片化し、かさ体積で約 200 μL となるようにはかり取った。これらの細片を注射用生理食塩水で洗浄後、1.5 mL 用滅菌済みチューブに充填した。

健常人から採血し、ヘパリン 15 IU/mL 含有静脈血を得た。血液に 1 mg/mL の濃度となるように BCG（日本 BCG 製造社製）を添加し、血液約 1.3 mL を上記充填チューブに添加し、実施例 1 と同様にして IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 6 に示した。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後において、血漿中の IFN- γ の値は全て 10 pg/mL 以下であった。また、B

CGだけを1mg/mLとなるように血液に添加し、同様にしてIFN- γ 濃度を測定した場合は31pg/mLであった。

【0067】

【表6】

	実施例					
	11	12	13	14	15	16
	未研磨	研磨				
		4000メッシュ	2400メッシュ	1200メッシュ	500メッシュ	220メッシュ
Ra値(μ m)	0.07	0.12	0.19	0.61	1.55	2.24
Sm値(μ m)	475	37	126	31	47	77
BCG濃度(mg/mL)	1	1	1	1	1	1
IFN- γ 誘導量(pg/mL)	36	71	73	141	158	169
BCG濃度0(mg/mL)時の IFN- γ 濃度(pg/mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10

【0068】

(実施例17~22)

担体5として、ポリスチレンフィルム（三菱モンサント社製、商品名：サントクリア）を用い、フィルム表面を精製水で洗浄した後、ストルアス社（デンマーク）製自動研磨機（商品名：プラノボールペデマックス）に、220、500、1200、2400、及び、4000メッシュのサンドペーパーを取り付けたものを用いて、ポリスチレンフィルムを研磨し、両側の表面に表面粗さを持つ研磨済みポリスチレンフィルムを作製した。このフィルムを精製水で洗浄後、5mm×5mmの大きさに細片化し、かさ体積で約200 μ Lとなるようにはかり取った。これらの細片を注射用生理食塩水で洗浄後、1.5mL用滅菌済みチューブに充填した。

健常人から採血し、ヘパリン15IU/mL含有静脈血を得た。血液に1mg/mLの濃度となるようにBCG（日本BCG製造社製）を添加し、血液約1.3mLを上記充填チューブに添加し、実施例1と同様にしてIFN- γ 誘導量を測定した。結果を表7に示した。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後において、血漿中のIFN- γ の値は全て10pg/mL以下であった。また、BCGだけを1mg/mLとなるように血液に添加し、同様にしてIFN- γ 濃度

を測定した場合は 31 pg/mL であった。

【0069】

【表 7】

	実施例					
	17	18	19	20	21	22
	未研磨	研磨				
		4000 メッシュ	2400 メッシュ	1200 メッシュ	500 メッシュ	220 メッシュ
Ra 値 (μm)	0.06	0.08	0.21	0.72	1.75	2.44
Sm 値 (μm)	375	52	43	27	39	71
BCG 濃度 (mg/mL)	1	1	1	1	1	1
IFN- γ 誘導量 (pg/mL)	48	92	94	239	269	246
BCG 濃度 0 (mg/mL) 時の IFN- γ 濃度 (pg/mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10

【0070】

(実施例 23)

酢酸セルロースペレット（アートプラス社製、可塑剤としてアセチルクエン酸トリエチル 30% 含有）を射出成形し、直径 2.5 mm の球状ビーズを作製した。このビーズ 50 g をメタノール 300 mL により、50℃で 24 時間ソックスレー抽出し、可塑剤を抽出した。しかる後、可塑剤が抽出されたビーズをステンレス製バットに取り出し、15 時間風乾した後、更に 80℃で 5 時間乾燥させた。

【0071】

ポットミル（東洋エンジニアリング社製、商品名：51-セラミックポットミル BP-5）に、上記ビーズ 200 mL 及び同容量の研磨剤として WHITE ABRAX (WA) #34（日本研磨材工業社製）を投入し、更にセラミックポットミル用ボール（東洋エンジニアリング社製、商品名：BB-13）数個を投入し、ボール研磨機（日陶科学社製ポットミル、商品名：AN-3S）により 5 時間研磨した。このようにして、Ra 値 1.36 μm 及び Sm 値 97.2 μm のビーズを得た（担体 6）。

【0072】

得られたビーズをメタノールで 3 回洗浄して、注射用生理食塩水で 5 回洗浄した。その後、かさ体積で 400 μL を実施例 1 と同様にして滅菌済み 1.5 mL 用チューブに入れ、血液を 1.1 mL 添加したこと以外は実施例 1 と同様にして、

IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 8 に示した。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後において、血漿中の IFN- γ の値は全て 10 pg/mL 以下であった。

【0073】

(実施例 24)

実施例 23 と同様にして、但し、非研磨の Ra 値 0.186 μ m、Sm 値 298.7 μ m の担体 7 を作製した。実施例 23 と同様に、血液と接触させ、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 8 に示した。

【0074】

(比較例 6)

担体 6 を用いなかったことと BCG 添加血液を 1.5 mL 用いたことを除いては、実施例 23 と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 8 に示した。

【0075】

(比較例 7)

BCG を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 23 と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 8 に示した。

【0076】

(比較例 8)

BCG を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 24 と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 8 に示した。

【0077】

【表 8】

	中心線平均粗さ Ra (μ m)	でこぼこ平均間隔 Sm (μ m)	BCG 濃度 (KE/mL)	IFN- γ 誘導量 (pg/mL)
実施例 23	1.36	97.2	1	198
実施例 24	0.19	298.7	1	101
比較例 6	—	—	1	38
比較例 7	1.36	97.2	0	<10
比較例 8	0.19	298.7	0	<10

【0078】

【発明の効果】

本発明は、上述の構成よりなるので、実用化レベルでサイトカインを効果的に誘導することができ、このため、本発明のサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法は、サイトカインの誘導が有効である様々な疾患の治療に好適に用いられる。また、本発明によれば、血液又は血液成分の導入部と導出部を有する容器の中でサイトカインを誘導し、点滴等によりサイトカイン誘導療法に利用することができるので、簡便で使い勝手の良いサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法として、サイトカインの誘導が有効である様々な疾患の治療に好適に用いられる。

【図面の簡単な説明】**【図 1】**

表面粗さを説明するための模式図であり、凹凸の「山」を説明するための図である。

【図 2】

表面粗さにおける凹凸平均間隔 S_m 値を説明するための図である。

【図 3】

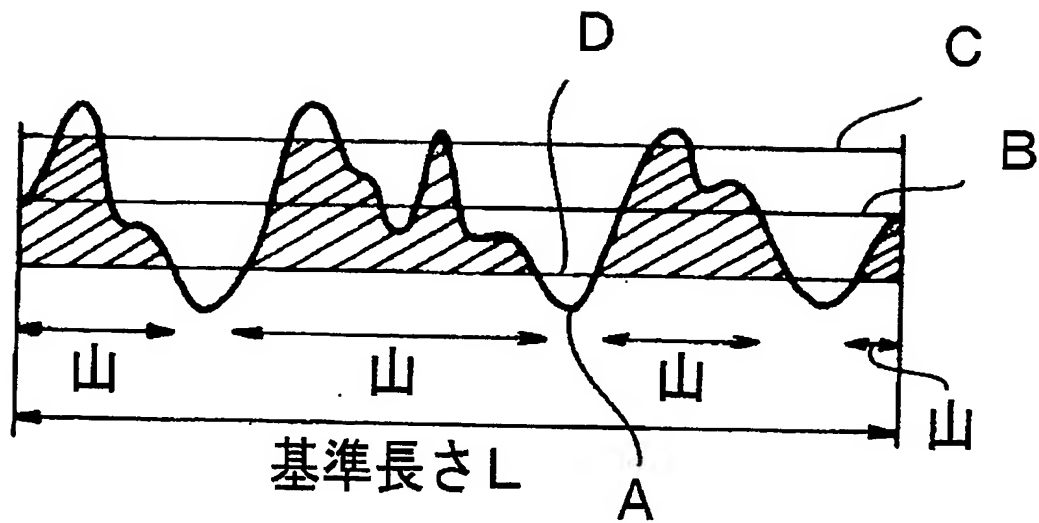
本発明のサイトカイン誘導用具の一例を示す模式的断面図である。

【符号の説明】

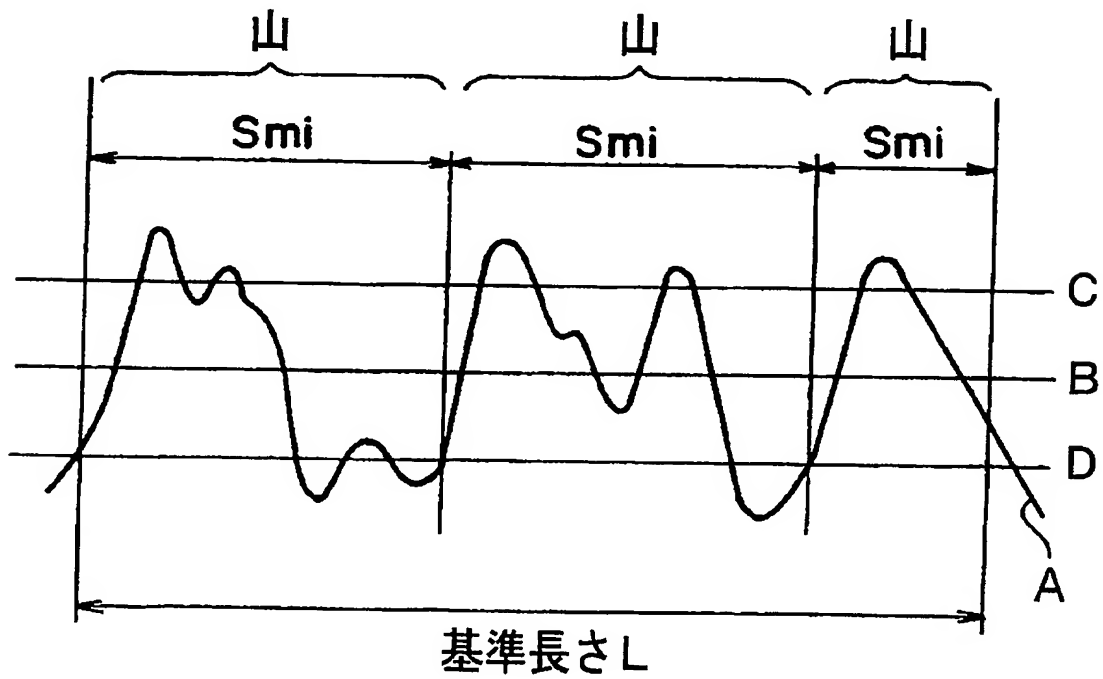
- 1 導入部
- 2 導出部
- 3 容器
- 4 担体とサイトカイン誘導剤とに接触した血液
- 5 担体及び／又はサイトカイン誘導剤の流出防止機構

【書類名】 図面

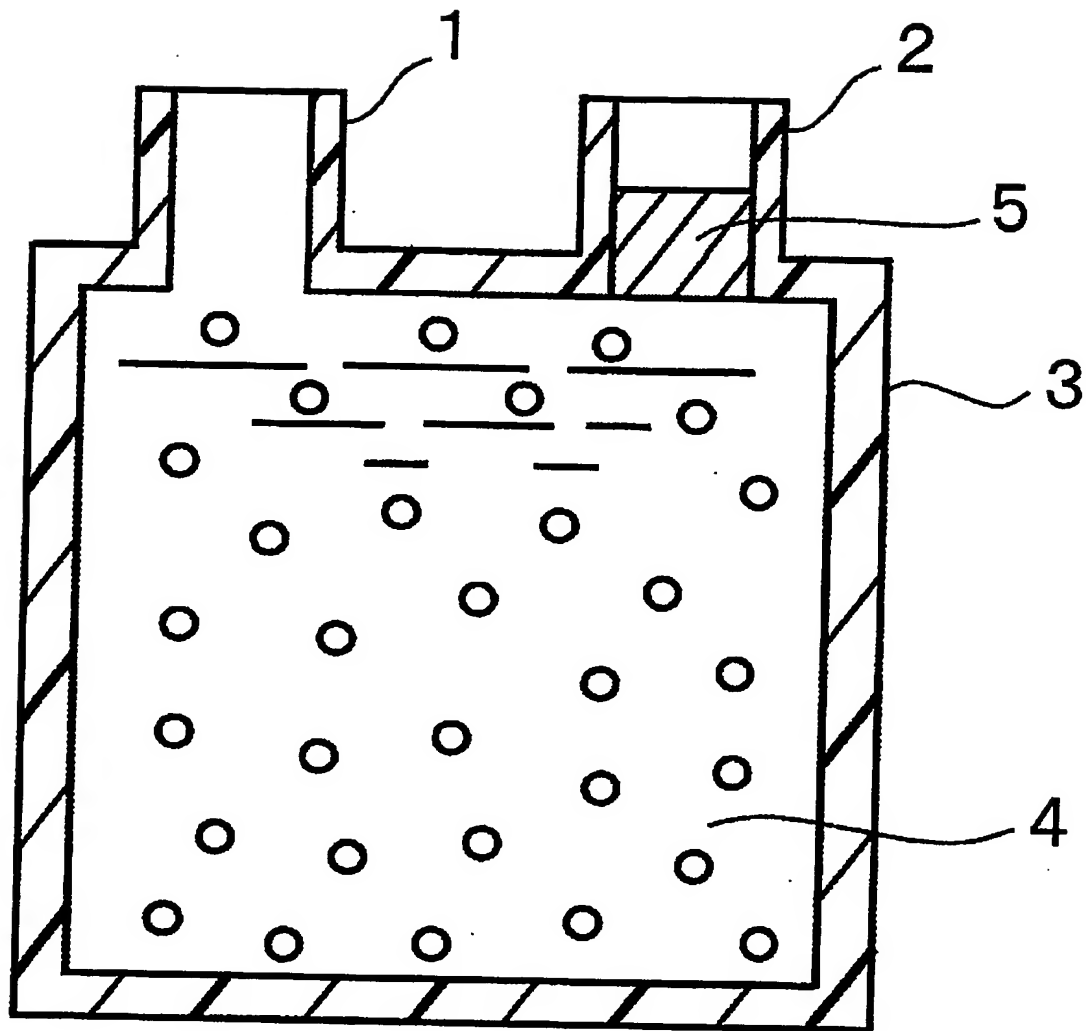
【図 1】



【図 2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 効果的なサイトカイン誘導療法を実現することを可能とする新規なサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法を提供する。

【解決手段】 水に不溶性の担体とサイトカイン誘導剤とを含有するサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 1 2 4 3 4 5

ページ： 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 2 1 7 4]

1. 変更年月日
[変更理由]

1 9 9 0 年 8 月 2 9 日

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区西天満 2 丁目 4 番 4 号

氏 名

積水化学工業株式会社